



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> :</b> <b>C12N 7/00, A61K 48/00</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 00/61726</b> <b>(43) Date de publication internationale: 19 octobre 2000 (19.10.00)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR00/00879 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 7 avril 2000 (07.04.00)  <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>99/04443 60/132,120</div> <div>9 avril 1999 (09.04.99) 30 avril 1999 (30.04.99)</div> <div>FR US</div> </div> <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> AVEN- TIS PHARMA S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond Aron, F-92160 Antony (FR).  <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> BLANCHE, Francis [FR/FR]; 14, rue des Solitaires, F-75019 Paris (FR). SHIH, Shian-Jiun [CN/US]; 1048 Flying Fish Street, Foster City, CA 94404 (US).  <b>(74) Mandataire:</b> LOBJOIS, Françoise; Aventis Pharma S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond Aron, F-92165 Antony Cedex (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AE, AG, AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, DZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des</i> <i>revendications, sera republiée si des modifications sont</i> <i>reçues.</i>
<b>(54) Title: COMPOSITION FOR THE PRESERVATION OF INFECTIOUS RECOMBINANT ADENOVIRUSES</b> <b>(54) Titre: COMPOSITION DESTINÉE A LA CONSERVATION D'ADENOVIRUS RECOMBINANTS INFECTIEUX</b>  <b>(57) Abstract</b> <p>Liquid or deep frozen compositions containing adenoviral particles, comprising a buffer solution that can fix the pH of the medium at slightly alkaline levels, with added glycerol and without the addition of divalent metal cations or alkaline cations.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>Compositions liquides ou congelées contenant les particules adénovirales comprenant une solution tampon capable de fixer le pH du milieu à des valeurs légèrement alcalines, additionnée de glycérol et sans adjonction de cations métalliques divalents ou de cations alcalins.</p>		

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce		de Macédoine	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroon		démocratique de Corée	PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

COMPOSITION DESTINEE A LA CONSERVATION D'ADENOVIRUS  
RECOMBINANTS INFECTIEUX

La présente invention concerne la conservation d'adénovirus sous une forme stabilisée et stockable et les compositions liquides ou congelées destinées à cette conservation.

- 5 La conservation d'adénovirus dans des compositions stables est un problème connu, qui a fait l'objet de nombreuses études, sans pour autant donner des résultats véritablement satisfaisants jusqu'à présent. Les virus recombinants ne sont en effet utilisables que si l'on parvient à les stocker sans dégradation et sans perte de leur pouvoir infectieux.
- 10 L'état physique des particules adénovirales, en solution, subit deux types d'altérations simultanément et rapidement au cours du temps : d'une part une agrégation (coagulation) des particules sous forme d'amas ou de filaments, qui est un phénomène extrêmement grave car il est irréversible, et d'autre part une désintégration de la structure icosaédrale des capsides elles-mêmes (par une lyse des capsides et libération
- 15 des capsomères dans le milieu).

Dans la demande internationale WO 98/02522 a été décrit un procédé de conservation de virus recombinants infectieux sous forme de suspension dans une solution aqueuse comprenant du saccharose. Les compositions préconisées ne contiennent pas de glycérol et contiennent selon un aspect préféré au moins un sel de cation divalent ou

20 de cation alcalin monovalent.

Cependant il peut être montré que le saccharose n'apporte pas systématiquement une stabilisation à +4°C, et selon les cas la stabilisation à cette température ne dépasse jamais une période de 2 semaines, ou au mieux inférieure à 2 mois.

Dans J. Virology, 70(11), 7498-7509 (1996) ont été décrites des conservations

25 d'adénovirus sous forme de solutions tampon à base de tampon Tris et de glycérol, mais contenant systématiquement du chlorure de magnésium. Ces préparations nécessitent une conservation à des températures très basses, de l'ordre de -70°C pour éviter une réduction de leur pouvoir infectieux.

Dans Human Gene Therapy, 7, 1693-99 (1996) est également utilisée une formulation

30 de stockage à base de tampon Tris et de glycérol, et comprenant du chlorure de magnésium. Cette formulation est conservée à -80°C.

Plus généralement, les formulations à base de Tris décrites dans la littérature à ce jour contiennent de façon systématique du chlorure de magnésium (1 mM en général) ou/et un sel à concentration physiologique (généralement NaCl à 150 mM). On peut citer par exemple à titre illustratif [Cell, 68, 143-155 (1992) ; Nature Genetics, 3, 229-234  
5 (1993) ; Human Gene Therapy, 6, 5-11 (1995) ; Human Gene Therapy, 6, 145-153 (1995) ; Human Gene Therapy, 6, 277-287 (1995) ; Human Gene Therapy, 6, 643-666 (1995) ; Human Gene Therapy, 6, 1039-1044 (1995) ; Human Gene Therapy, 6, 1317-1322 (1995) ; Human Gene Therapy, 6, 1587-1593 (1995) ; Human Gene Therapy, 7, 2177-2184 (1996) ; J. Virology, 73, 1601-1608 (1999)]. Lorsque les  
10 auteurs le précisent, la conservation du virus est effectuée systématiquement à -70°C / -80°C.

Il a été montré depuis, que l'évolution de la structure virale (agrégation et lyse) est un phénomène très dépendant de facteurs tels que la concentration de certains contre-ions cationiques ajoutés à la solution et aussi tels que la concentration d'adénovirus. Au  
15 dessus de concentrations de 1E12 pv/ml environ, l'agrégation et la désintégration des capsides (donc la perte de pouvoir infectieux) sont observées en quelques heures à quelques jours, selon les compositions pharmaceutiques utilisées, alors que ces phénomènes deviennent plus lents à faible concentration. De ce fait il est particulièrement difficile de conserver pendant un temps prolongé des compositions  
20 fortement concentrées en particules virales.

Il a été ainsi trouvé, et c'est ce qui fait l'objet de la présente invention, que les adénovirus recombinants infectieux pouvaient être conservés en milieu aqueux, à des températures comprises entre +4 et +20°C, sous forme de suspension dans une solution tampon capable de fixer le pH du milieu à des valeurs légèrement alcalines,  
25 additionnée de glycérol et sans adjonction de cations métalliques divalents ou de cations alcalins.

Plus spécifiquement le pH du milieu est fixé entre 8,0 et 9,6.

Les compositions liquides ou congelées contenant les particules adénovirales dans une solution tampon additionnée de glycérol entrent dans le cadre de la présente invention.  
30 Ces compositions présentent l'avantage considérable d'une bonne stabilité, mais aussi d'être particulièrement adaptées à la conservation pendant un temps prolongé de concentrations élevées en particules virales.

Selon l'invention, la solution tampon capable de fixer le pH du milieu entre 8,0 et 9,6 est constituée soit d'un système acide/base comprenant le Tris [tris(hydroxyméthyl)aminométhane], ou la lysine et un acide choisi parmi un acide fort (acide chlorhydrique par exemple) ou un acide faible (acide maléique, acide malique, ou acide acétique par exemple), soit d'un système acide/base comprenant l'Hepes [acide 2-(4-(2-hydroxyéthyl pipérazin)-1-yl)éthanesulfonique] et une base forte (soude par exemple).

De préférence le pH est fixé entre 8,4 et 8,8 et encore plus particulièrement à 8,4 (valeur mesurée à 25°C).

La concentration de la solution tampon est déterminée de manière à exercer l'effet tampon dans une limite et un volume ou la valeur du pH ne soit pas affectée. La concentration molaire en acide + base peut varier de 10 à 500 mM, de préférence de 20 à 100 mM, et plus particulièrement elle est fixée à 20 mM. Parmi les systèmes tampons selon l'invention, la solution tampon Tris/HCl à une concentration de 20 mM donne des résultats particulièrement satisfaisants.

Selon l'invention, la composition contient 10 à 50 % de glycérol, et de préférence entre 20 et 25 % (volumes à volumes).

Les compositions selon l'invention peuvent en outre contenir optionnellement d'autres adjuvants. Ces derniers peuvent être choisis parmi des polymères (polyéthylène glycols, par exemple PEG 400, PEG 8000), les pluronics (Pluronic F68 par exemple) notamment à raison d'environ 1 à 20 % en poids, les polysorbates (notamment le Tween-20, par exemple à 0,01 à 1 % en poids), ou choisi parmi des sucres comme par exemple le saccharose, le mannitol, ou le dextrose (notamment à raison d'environ 5 à 10 %) ou encore parmi les alcools (notamment l'éthanol) à raison de 1 à 10 % en volume.

Les compositions selon l'invention sont particulièrement adaptées à la conservation des préparations adénovirales de forte concentration. En effet les compositions ainsi stabilisées permettent de maintenir les particules virales en suspension aqueuse liquide (notamment entre +4 et +20°C) tout en préservant le pouvoir infectieux du virus et ceci même à des concentrations virales très élevées (depuis des valeurs de 1E8 pv/ml jusqu'à 1E12 pv/ml ou jusqu'à 1E13 pv/ml et pouvant même aller jusqu'à 5E13 pv/ml).

Selon une autre alternative de l'invention le virus peut aussi être congelé à -20°C, conservé ainsi plusieurs mois ou plus longtemps, puis décongelé dans cette formulation sans dommage ni pour sa structure ni pour son pouvoir infectieux.

5 Selon l'invention, les compositions peuvent être préparées par mise en suspension dans la solution tampon, de particules adénovirales initialement obtenues en solution aqueuse, puis purifiées, suivie de l'addition de glycérol et éventuellement de l'addition d'un adjuvant tel que cité précédemment.

10 L'adénovirus recombinant infectieux peut être obtenu suivant les méthodes habituelles de production dans des cellules de lignées transcomplémentantes d'encapsidation, par exemple les cellules de la lignée 293 ou de la lignée PER-C6. Les particules virales peuvent être ensuite purifiées par centrifugation en gradient de chlorure de césium comme décrit par exemple dans Journal of General Virology, 34, 19-35 (1977). Plus  
15 préférentiellement les particules virales sont purifiées par chromatographie liquide en mode d'échange d'anion, de filtration sur gel, en mode hydrophobe ou par chélation de métal. La purification par échange d'anion est particulièrement avantageuse puisqu'elle permet d'obtenir en une seule étape de chromatographie une préparation virale pure, débarrassée des protéines, des acides nucléiques, et autres impuretés et métabolites provenant de la cellule productrice, et débarrassée des composés apportés par le milieu de culture. Des modes préférés de purification par chromatographie sont décrits dans  
20 la demande internationale WO 98/00524 ou comme ci-après dans les exemples. Les particules adénovirales sont ensuite formulées dans le tampon de conservation sélectionné en utilisant notamment des méthodes de dialyse, de diafiltration, ou de chromatographie de filtration sur gel.

25 La composition ainsi obtenue peut être éventuellement congelée et conservée à une température de stockage souhaitée (par exemple -20°C), mais cette opération n'est cependant pas indispensable à la conservation sur une longue durée, les compositions étant stables à l'état liquide entre +4 et +20°C.

30 Les compositions selon l'invention sont stables, sans dégradation notable [stabilité physique et biologique (pouvoir infectieux)] pendant une durée d'au moins 12 mois à +4°C ou d'au moins 5 mois à +20°C. On entend plus particulièrement par solution stable physiquement, une solution ne présentant pas d'apparition de coagulation, de sédimentation de particules ou de précipité (par estimation visuelle, par mesure de la densité optique, par l'analyse en microscopie électronique, ou par l'analyse de distribution de taille des particules) après la période de conservation considérée.

La présente invention concerne plus particulièrement la conservation d'adénovirus infectieux sous une forme stabilisée et les compositions liquides ou congelées destinées à cette conservation.

5 La formulation selon l'invention présente l'intérêt d'être la première composition réalisée permettant la conservation des adénovirus sous forme liquide à des températures de +4 à +20°C tout en ayant la possibilité d'avoir une concentration virale élevée. L'invention est particulièrement intéressante dans son application aux adénovirus recombinants, mais elle peut être appliquée d'une manière générale à tous les adénovirus (sauvages ou recombinants).

10 A titre d'exemple peuvent être cités notamment les adénovirus ci-après qui peuvent être avantageusement conservés dans une composition selon l'invention : l'ensemble des adénovirus sauvages humains, appartenant aux six sous-groupes connus dénommés A, B, C, D, E, et F, et plus particulièrement l'ensemble des 49 sérotypes différents d'adénovirus humains composant ces six sous-groupes. De même,  
15 l'invention pourra s'appliquer aux virus sauvages simiens, bovins, équins, porcins, ovins, ou canins appartenant à la famille des *Adenoviridae*. De plus, l'invention pourra s'appliquer aux virus mutants provenant des virus sauvages appartenant à la famille des *Adenoviridae*.

20 Parmi les vecteurs adénovirus recombinants auxquels la présente invention peut s'appliquer, on peut citer tous les adénovirus modifiés comportant une ou plusieurs délétion dans la région du génome appelée E1, ou dans la région E2, ou dans la région E3 ou dans la région E4, ainsi que les virus recombinants comportant plusieurs délétions combinées dans les régions ci-dessus, ainsi qu'aux virus recombinants complètement déletés (appelés gutless) [FASEB, 11, 615 (1997)].

25 De même, la présente invention s'applique aussi aux vecteurs adénoviraux recombinants comportant en outre un acide nucléique d'intérêt. L'acide nucléique d'intérêt peut être inséré en différents sites du génome de l'adénovirus. Avantagusement, il est inséré au niveau de la région E1, E3, ou E4. Cependant, il est clair que d'autres sites peuvent être utilisés. En particulier, l'accès à la séquence  
30 nucléotidique du génome permet à l'homme du métier d'identifier des régions permettant d'insérer l'acide nucléique d'intérêt. L'acide nucléique d'intérêt peut être toute séquence d'ADN introduite, en particulier toute séquence dont le transfert et/ou l'expression dans la cellule cible est recherchée.

En particulier, il peut comporter un ou plusieurs gènes thérapeutiques et/ou un ou plusieurs gènes codant pour des protéines antigéniques. Les gènes thérapeutiques qui peuvent ainsi être transférés sont tous les gènes dont la transcription et éventuellement la traduction dans la cellule cible génèrent des produits ayant un effet thérapeutique.

- 5 Parmi les produits thérapeutiques, on peut citer plus particulièrement les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc (WO93/19191), les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques : BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, etc., les apolipoprotéines : ApoA1, ApoIV, ApoE, etc.
- 10 (WO94/25073), la dystrophine ou une minidystrophine (WO93/06223), les gènes permettant de contrôler la resténose : GAX, NOS, etc., les gènes suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc (WO94/24297), les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation : Facteurs VII, VIII, IX, les gènes suicides : TK, etc., les immunoglobulines naturelles ou artificielles : Fab, ScFv (WO94/29446),
- 15 les gènes anti-apoptotiques : AKT, etc.

- Le gène thérapeutique peut également être un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent par exemple être transcrites, dans la cellule cible, en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et
- 20 bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans la demande de brevet EP 140 308.

- De même, la présente invention s'applique aux vecteurs adénoviraux recombinants permettant la production de rétrovirus [Tumor Targeting, 3, 59 (1998)], aux adénovirus comportant une ou plusieurs modifications dans une ou plusieurs protéines
- 25 constitutives de la capside virale, en particulier la fibre (protéine IV) et la protéine hexon (protéine II), ou aux adénovirus dépourvus de fibre [Journal of Virology, 73, 1601 (1999)], chacune de ces modifications ayant été introduite dans le but de modifier le tropisme naturel de l'adénovirus [Current Opinion in Biotechnology, 8, 583 (1997)].

- 30 Par ailleurs, les compositions selon l'invention sont particulièrement intéressantes du fait qu'elles peuvent être utilisées pour la préparation d'un médicament destiné à un traitement thérapeutique ou prophylactique par thérapie génique.



Les virus infectieux ont de nombreuses applications parmi lesquelles on peut citer leur utilisation dans le domaine de la vaccination et dans le domaine de la thérapie génique. Dans ces applications, après transfert de leur matériel génétique (ARN ou ADN) dans la cellule hôte, les virus utilisent la machinerie cellulaire de la cellule infectée pour  
5 réaliser la synthèse de protéines codées par leur propre génome, et induire ainsi l'effet biologique spécifique recherché. Dans des applications de thérapie génique, des virus recombinants infectieux portant un gène d'intérêt thérapeutique sont utilisés pour transférer ce gène dans des cellules spécifiques de l'organe du patient à traiter. Une grande variété de protocoles thérapeutiques ont été décrits et sont actuellement en  
10 cours d'évaluation clinique pour transférer et exprimer des gènes thérapeutiques à l'aide de vecteurs viraux. Parmi ces vecteurs, les vecteurs adénoviraux non réplicatifs ont été largement développés durant ces dernières années pour le transfert de gènes codant pour des protéines thérapeutiques. Parmi ces gènes, on peut citer le gène suppresseur de tumeur p53, qui est impliqué dans le contrôle de la prolifération  
15 cellulaire. Divers protocoles d'essais cliniques de transfert du gène p53 à l'aide d'adénovirus chez l'homme sont actuellement développés dans des indications anticancéreuses. Parmi les autres applications en développement, on peut citer le cas du traitement de la mucoviscidose.

L'utilisation de vecteurs adénoviraux comme agents thérapeutiques n'est envisageable  
20 que si l'on dispose de méthodes permettant de conserver et stocker les préparations durant des périodes suffisantes longues sans perte significative du pouvoir infectieux des virus en question. C'est pourquoi la présente invention est particulièrement intéressante.

Les exemples suivants donnés à titre non limitatif, montrent comment l'invention peut  
25 être mise en pratique, ainsi que la stabilité des compositions et le pouvoir infectieux des particules ainsi formulées.

### **Exemple 1**

#### **Préparation d'une composition selon l'invention :**

Une suspension virale est préparée de la manière suivante : les cellules 293 sont  
30 cultivées dans un CellCube (Costar) dans un milieu DMEM supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal. Lorsqu'elles atteignent la confluence, les cellules sont infectées à une multiplicité d'infection de 2 avec une aliquote de la banque de travail de l'adénovirus exprimant le gène p53. Cinq jours après l'infection, le surnageant de

production est récolté par drainage et clarifié par passage à travers un train de filtres de porosité décroissante 10/1/0,8-0,2 µm. Ce surnageant est ensuite concentré 20 fois en volume par ultrafiltration tangentielle sur une membrane Millipore ayant un seuil de coupure de 300 kDa. Le virus est ensuite purifié par chromatographie sur une colonne de Source 15Q équilibrée et éluée avec un gradient de chlorure de sodium dans du tampon 20 mM Tris/HCl, pH 8,0. Le pic de virus est collecté, et le virus est concentré par ultrafiltration tangentielle sur une membrane Millipore ayant un seuil de coupure de 300 kDa. Les préparations virales ainsi obtenues sont de très grande pureté et contiennent < 50 ng d'albumine bovine sérique et < 10 ng d'ADN de la cellule hôte pour 1E12 particules virales. Le virus est ensuite formulé dans les divers tampons sélectionnés. Pour effectuer cette opération, le changement de tampon est effectué par chromatographie sur colonne PD-10 (Amersham-Pharmacia Biotech) remplie de Sephadex G-25 équilibrée et éluée avec le tampon sélectionné en suivant les instructions du fournisseur. Après dosage par chromatographie, la concentration du virus est ajustée si nécessaire à la valeur cible par dilution dans le tampon de formulation sélectionné. La stabilité virale dans les diverses formulations est ensuite étudiée en plaçant pour chacune des formulations sélectionnées, 2 ml de suspension virale dans un tube en polypropylène à la température étudiée (-20°C, +4°C, ou +20°C). Les échantillons sont ensuite conservés à cette température durant une période déterminée pour chacune des expériences en question (voir exemples ci-après).

Les analyses par microscopie électronique sont effectuées par dépôt de la solution à analyser sur une grille carbonée qui est ensuite traitée en coloration négative par l'acétate d'uranyle à 1,5 %. L'appareil utilisé pour ces analyse est un microscope électronique Jeol 1010 opérant à une tension de 50 kV à 100 kV.

Les analyses de distribution de taille des particules virales sont effectuées par spectroscopie de corrélation de photons (PCS) à l'aide d'un appareil Coulter N4+ (Coultronics).

Les analyses CLHP (chromatographie liquide hautes performances) permettant de quantifier les particules virales sont effectuées comme décrit ci-après :

Une colonne de chromatographie remplie avec environ 1 ml de Q Sepharose® XL (45-165 µm; Amersham-Pharmacia Biotech) est préparée dans une colonne de type HR 5/5 (Amersham-Pharmacia Biotech). Cette colonne, montée sur un système CLHP équipé d'un système de détection UV/visible opérant dans la plage d'absorbance 200-

300 nm, est utilisée pour la séparation et la quantification des particules virales. Avant chaque analyse, la colonne est équilibrée à 30°C dans un tampon 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 à un débit de 1,5 ml/min. L'échantillon à analyser contenant les particules virales est injecté sur la colonne. Après l'injection, la colonne est lavée avec 5 volumes du même tampon, et les espèces fixées sont éluées avec un gradient linéaire de 0 à 1 M de chlorure de sodium dans le tampon 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 sur 30 volumes de colonne. En fin de gradient, la colonne est lavée avec 2 volumes de colonne de soude 0,5 N avant ré-équilibration en vue de l'analyse suivante.

Une courbe étalon à 260 nm est construite avec une préparation de particules d'adénovirus purifiée par chromatographie. Cette préparation étalon a été titrée au préalable en particules par son absorbance à 260 nm dans une solution de SDS à 0,1% en utilisant le facteur de conversion de  $1 \times 10^{10}$  particules par unité d'absorbance à 260 nm). Les échantillons sont filtrés au travers d'un filtre (0,22 µm) avant l'analyse par chromatographie.

La technique de titration des adénovirus est décrite par F. L. Graham et al., Molecular Biotechnology, 3, 207 (1995). La technique de mesure de l'expression de la protéine penton par immunotitration suivie d'une quantification par cytométrie de flux est décrite dans Boyle et al., « Determination of adenoviral vector activity using an immunotitration method », poster présenté au « 5<sup>th</sup> annual meeting of viral vector and vaccines, (1998) ».

### **Exemple 2**

#### **Conservation à +4°C de compositions selon l'invention ; stabilité physique des particules virales :**

Le tableau ci-après montre les résultats obtenus en fonction de la nature de la solution tampon et la stabilité physique des particules virales déterminée par l'analyse chromatographique des préparations :

Formulation	Concentration initiale ( $\times 10^{12}$ pv/ml)	Concentration virale au temps considéré (en jours) ( $\times 10^{12}$ pv/ml)					
		10	15	20	35	60	90
*Tris/HCl + glycérol 10%	8,9	9,8			9,7	10,1	10,2
*Tris/HCl + glycérol 10% + pluronic F68 10%	8,3	9,0			8,4	9,0	8,9
*Tris/HCl + glycérol 10% + PEG 400 10%	6,6	7,2			7,2	6,9	
*Tris/HCl + glycérol 10% + PEG 8000 10%	7,5	8,0			8,2	8,6	8,0
*Tris/HCl + glycérol 10% + saccharose 5%	7,4		7,7		8,5	7,9	8,5
L-Lysine [20 mM, pH = 8,4] + glycérol 10%	8,7	10,3			9,2		
<b>Comparaison</b>							
*Tris/HCl + saccharose 5%	6,3		5,7	1,9	0,015		
*Tris/HCl + saccharose 10%	10,5	8,4		0,7			

\*Tris/HCl : 20 mM ; pH = 8,4 - % glycérol : vol/vol - % saccharose : vol/vol

### **Exemple 3**

#### **Conservation à +4°C de compositions selon l'invention ; effet de la concentration en glycérol :**

Le tableau ci-après montre les résultats obtenus en fonction de la concentration en glycérol dans la formulation et donne la stabilité physique des particules virales déterminée par l'analyse chromatographique des préparations :

Formulation	Concentration virale ( x 10 <sup>12</sup> pv/ml) au temps considéré								
	0	15 jours	1 mois	2 mois	3 mois	4,5 mois	6 mois	9 mois	12 mois
*Tris/HCl + glycérol 10% (vol/vol)	6,7	7,9	8,2	7,8	8,4	7,5	6,0	0,3	-
*Tris/HCl + glycérol 15 % (vol/vol)	5,8	6,7	6,8	6,9	6,8	6,3	5,8	6,4	5,9
*Tris/HCl + glycérol 20 % (vol/vol)	5,4	6,3	6,5	6,4	7,1	6,0	5,8	6,0	5,9
*Tris/HCl + glycérol 25 % (vol/vol)	5,7	6,5	6,6	6,6	7,1	6,5	6,2	6,4	6,4
<b>Comparaison</b>									
Tris/HCl 10 mM + MgCl <sub>2</sub> 1mM + glycérol 10% (vol/vol)	11,8	10,4	0,9	-	-	-	-	-	-
Tris/HCl 10 mM + MgCl <sub>2</sub> 1mM + NaCl 150 mM + glycérol 10% (vol/vol)	10,3	5,0	0,8	-	-	-	-	-	-
Tris/HCl 10 mM + MgCl <sub>2</sub> 1mM + saccharose 1M	6,9	7,7	7,6	5,9	0,58	0,47	0,15	0,25	-

\*Tris/HCl : 20 mM, pH = 8,4.

Les résultats présentés dans le tableau ci-dessus confirment clairement qu'une teneur de 10 % (vol/vol) est efficace pour la stabilisation physique des particules sur une période de 6 mois. L'efficacité est également confirmée sur une période de 1 an au moins pour les formulations incluant plus de 10 % de glycérol. Aucune des formulations antérieurement connues n'apportait une stabilisation sur une durée aussi prolongée : notamment la formulation comprenant Tris/HCl 10 mM + MgCl<sub>2</sub> 1mM + saccharose 1M ne s'avère pas appropriée pour stabiliser les particules adénovirales à concentration élevée (6,9 x 10<sup>12</sup> pv/ml), la concentration virale chute rapidement à partir du 2<sup>ème</sup> mois.

**Exemple 4****Pouvoir infectieux des adénovirus conservés selon l'invention à +4 ou +20°C :**

Le pouvoir infectieux des particules virales est mesuré par la capacité des particules à exprimer le transgène qu'elles comportent et à conduire à l'expression de la protéine correspondante. La protéine est ici la protéine penton (protéine III) qui est détectée par immunotitration en utilisant une méthode de marquage avec un anticorps (anti-penton) suivie d'une analyse en cytométrie de flux. Le résultat obtenu est exprimé en unités d'infection par ml de solution (UI/ml). Le calcul du ratio pv/IU représente une seconde façon d'exprimer l'évolution du titre infectieux au cours du temps. Dans les conditions expérimentales utilisées, ce ratio a une valeur de  $20 \pm 10$  environ pour une préparation virale fraîchement obtenue avant mise en conservation.

Le tableau ci-après montre le pouvoir infectieux des particules formulées en glycérol ou en saccharose après 6 ou 12 mois de conservation à +4°C ou après 1 mois de conservation à +4°C puis 3,5 mois de conservation à +20°C.

Formulation	Titre Initial	Titre après 12 mois à +4°C				Titre après 6 mois à +4°C				Titre après 1 mois à +4°C puis 3,5 mois à +20°C			
		pv/ml (x 10 <sup>12</sup> )	pv/ml (x 10 <sup>12</sup> )	UI/ml (x 10 <sup>11</sup> )	pv/UI	pv/ml (x 10 <sup>12</sup> )	UI/ml (x 10 <sup>11</sup> )	pv/UI	pv/ml (x 10 <sup>12</sup> )	UI/ml (x 10 <sup>11</sup> )	pv/ml (x 10 <sup>12</sup> )	UI/ml (x 10 <sup>11</sup> )	pv/UI
*Tris/HCl + 10 % glycérol	6,7					6,0	3,0	20	4,2	1,1			38
*Tris/HCl + 15 % glycérol	5,8	5,9	6,2		9,5	5,8	4,1	14	5,3	1,4			38
*Tris/HCl + 20 % glycérol	5,4	5,9	4,5		13	5,8	4,6	13	5,4	1,4			39
*Tris/HCl + 25 % glycérol	5,7	6,4	7,4		8,6	6,2	5,0	12	6,1	1,8			34
<b>Comparalson</b>													
10 mM Tris/HCl + 1 mM MgCl <sub>2</sub> + 1 M saccharose	6,9	-	-	-	-	0,15	< 0,004	> 375	1,0	0,08			125
10 mM Tris/HCl + 1 mM MgCl <sub>2</sub> + 1 M saccharose	0,36	0,33	0,33		10	0,30	0,36	9	0,32	< 0,004			> 800

\*Tris/HCl : 20 mM, pH = 8,4.

Cette étude montre que l'activité virale est particulièrement bien préservée à +4°C pour toutes les concentrations en glycérol égales ou supérieures à 10 %, et plus spécialement encore pour toutes les concentrations en glycérol égales ou supérieures à 15%. De même, les préparations conservées 1 mois à +4°C puis 3,5 mois à +20°C et contenant au moins 10 % de glycérol ont conservé leur capacité d'infection. La possibilité de conserver à long terme et à température ambiante, des préparations adénovirales très concentrées est démontrée pour la première fois. La formulation de comparaison contenant du saccharose et du chlorure de magnésium ne permet pas la conservation du virus concentré ( $6,9 \times 10^{12}$  pv/ml) ni à +4°C ni à +20°C. La formulation à faible concentration ( $0,36 \times 10^{12}$  pv/ml) voit son titre décroître après une conservation d'un mois à +4°C suivie d'une conservation de 3,5 mois à +20°C. Les formulations contenant du saccharose sont totalement inadaptées lorsque l'on augmente la concentration.

Après trois mois de conservation, les différentes préparations ont été analysées par microscopie électronique. Ces analyses montrent que :

A une concentration de 20 % en glycérol les particules apparaissent natives, pleines, entières, et symétriques. Pratiquement aucune sous-unité libre n'est détectable dans le milieu. En revanche, dans la formulation de comparaison à concentration virale élevée, les particules sont pour la plupart agrégées soit en massifs contenant environ 50 particules, soit en structures filamenteuses. Certaines particules ont perdu une partie de leurs capsomères et ont une structure plus arrondie ou ovoïde. Les capsomères et les fibres libérés dans le milieu restent totalement dispersés et sont très facilement observables. Ceci est observé aussi bien à +4°C qu'à +20°C.

Après 12 mois à 4°C, les particules conservées dans 20% de glycérol apparaissent inchangées (pleines, entières et symétriques).

### **Exemple 5**

**Pouvoir infectieux d'une préparation adénovirale formulée dans le Tris/HCl + glycérol et conservée à -20°C :**

Dans cet exemple, le pouvoir infectieux des particules est déterminée par la titration en pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond à la détermination du pouvoir infectieux d'une solution d'adénovirus. Cette détermination est effectuée par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 15 jours d'incubation, du nombre de plages de cellules infectées. Ces dosages reposent sur des



méthodes biologiques et les valeurs obtenues sont dans une certaine mesure fonction des conditions opératoires utilisées [J. Virol., 70, 7498 (1996)].

Le tableau ci-après montre le titre infectieux, mesuré dans un test pfu, d'une préparation virale conservé 2 mois à -20°C.

Formulation	Titre initial	Titre à J60	Titre à J60	Ratio pv/pfu
	pv/ml (x 10 <sup>12</sup> )	pv/ml (x 10 <sup>12</sup> )	pfu/ml (x 10 <sup>11</sup> )	à J 60
20 mM Tris/HCl (pH 8,4) + 10 % glycérol	7,7	7,7	3,0	26

- 5 La valeur de la mesure du titre infectieux, et plus particulièrement le ratio pv/pfu indiquent que les particules virales n'ont pas été altérées par l'étape de congélation-décongélation, ni par la conservation durant 2 mois à -20°C. (Ce ratio a une valeur de 20 à 30 environ pour la préparation virale initiale).

#### Exemple 6

- 10 **Conservation à +4°C de compositions selon l'invention ; stabilité physique des particules virales :**

Le tableau ci-après montre les résultats obtenus en fonction de la nature de la solution tampon et la stabilité physique des particules virales déterminée par l'analyse chromatographique des préparations :

Formulation	Concentration initiale (x10 <sup>12</sup> pv/ml)	Concentration virale au temps considéré (en jours) (x10 <sup>12</sup> pv/ml)		
		30	60	90
20 mM Tris/HCl (pH 8,4) + glycérol 20 %	29,2	31,4	32,1	33,7
100 mM Tris/HCl (pH 8,4) + glycérol 20 %	7,7	8,4	6,0	8,3
20 mM Tris/HCl (pH 8,4) + glycérol 20 % + éthanol 10 %	13,9	14,8	14,7	15,0
20 mM Lysine/HCl (pH 8,4) + glycérol 20 %	7,8	8,4	6,8	7,7
20 mM Hepes/Na (pH 8,4) + glycérol 20 %	7,9	8,4	7,0	8,6

**Exemple 7**

**Conservation à +4°C de compositions selon l'invention ; effet du pH des solutions tampon :**

- Le tableau ci-après montre l'effet du pH de la solution tampon sur le pouvoir infectieux des particules formulées dans le Tris 20mM, glycérol 10%, après 3 mois de conservation :

Formulation Tris/HCl 20 mM + glycérol 10 %	Titre initial ( $\times 10^{12}$ pv/ml)	Titre après 3 mois à +4°C		
		pv/ml ( $\times 10^{12}$ )	UI/ml ( $\times 10^{11}$ )	pv/UI
pH = 7,5	3,1	2,5	0,18	136
pH = 8,0	6,7	6,1	1,1	56
pH = 8,5	7,2	7,0	1,6	44
pH = 9,0	6,4	5,8	1,2	48
pH = 9,5	6,0	5,5	2,0	28

Cette étude montre que l'activité virale est particulièrement bien préservée à +4°C dans les formulations Tris/HCl 20 mM contenant 10 % de glycérol à des pH allant de 8,0 à 9,5.

- 10 Au dessous de pH = 8,0, la stabilité n'est plus assurée à +4°C.

REVENDEICATIONS

- 1- Composition liquide ou congelée contenant les particules adénovirales caractérisée en ce qu'elle comprend une solution tampon capable de fixer le pH du milieu entre 8,0 et 9,6, additionnée de glycérol et sans adjonction de cations métalliques divalents ou de cations alcalins.  
5
- 2- Composition liquide ou congelée, selon la revendication 1, caractérisée en ce que la solution tampon est une solution capable de fixer le pH du milieu entre 8,4 et 8,8.
- 3- Composition liquide ou congelée, selon la revendication 2, caractérisée en ce que la solution tampon est une solution capable de fixer le pH du milieu à 8,4.  
10
- 4- Composition liquide ou congelée, selon la revendication 1, caractérisée en ce que la solution tampon est constituée d'un système acide/base comprenant le Tris ou la lysine et un acide choisi parmi un acide fort ou un acide faible, ou bien d'un système acide/base comprenant l'Hepes et une base forte.
- 15 5- Composition liquide ou congelée, selon la revendication 4, caractérisée en ce que que la solution tampon est constituée d'un système acide/base choisi parmi les systèmes Tris/HCl, lysine/HCl, Tris/acide maléique, Tris/acide malique, Tris/acide acétique et Hepes/soude.
- 6- Composition liquide ou congelée, selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle contient en outre un adjuvant choisi parmi des polymères, des sucres, ou un alcool.  
20
- 7- Composition liquide ou congelée, selon la revendication 6, caractérisée en ce que les polymères sont choisis parmi les polyéthylène glycols, les pluronics ou les polysorbates, les sucres sont choisis parmi le saccharose, le dextrose ou le mannitol et l'alcool est l'éthanol.  
25
- 8- Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 7 pour la conservation d'adénovirus.
- 9- Utilisation thérapeutique ou prophylactique d'une composition de particules adénovirales selon l'une des revendications 1 à 7, pour la préparation d'un médicament destiné à un traitement par thérapie génique.  
30

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 00/00879

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C12N7/00 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE, EMBASE, LIFESCIENCES, SCISEARCH, BIOSIS, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KANEGAE Y ET AL: "A simple and efficient method for purification of infectious recombinant adenovirus." JAPANESE JOURNAL OF MEDICAL SCIENCE AND BIOLOGY, (1994 JUN) 47 (3) 157-66., XP000876518 page 161 -page 162	1,4-9
A	KALICHARRAN K K ET AL: "Studies on the stability of a human adenovirus -rabies recombinant vaccine." CANADIAN JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH, (1992 JAN) 56 (1) 28-33., XP000867628 the whole document	1-9
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 September 2000

Date of mailing of the international search report

13/09/2000

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreau, J

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

I. International Application No

PCT/FR 00/00879

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR 2 751 343 A (TRANSGENE SA) 23 January 1998 (1998-01-23) cited in the application page 13 -page 16 -----	1-9

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/00879

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2751343 A	23-01-1998	AU 711409 B	14-10-1999
		AU 3698697 A	09-02-1998
		CA 2232604 A	22-01-1998
		EP 0853660 A	22-07-1998
		WO 9802522 A	22-01-1998
		JP 2000500026 T	11-01-2000
<hr/>			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

L. demande internationale No

PCT/FR 00/00879

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 C12N7/00 A61K48/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE, EMBASE, LIFESCIENCES, SCISEARCH, BIOSIS, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	KANEGAE Y ET AL: "A simple and efficient method for purification of infectious recombinant adenovirus." JAPANESE JOURNAL OF MEDICAL SCIENCE AND BIOLOGY, (1994 JUN) 47 (3) 157-66., XP000876518 page 161 -page 162	1,4-9
A	KALICHARRAN K K ET AL: "Studies on the stability of a human adenovirus -rabies recombinant vaccine." CANADIAN JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH, (1992 JAN) 56 (1) 28-33., XP000867628 le document en entier --- -/--	1-9



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"8" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

6 septembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

13/09/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo.nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Moreau, J

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

ande Internationale No  
PCT/FR 00/00879

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	FR 2 751 343 A (TRANSGENE SA) 23 janvier 1998 (1998-01-23) cité dans la demande page 13 -page 16 -----	1-9



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

ande Internationale No

PCT/FR 00/00879

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2751343 A	23-01-1998	AU 711409 B	14-10-1999
		AU 3698697 A	09-02-1998
		CA 2232604 A	22-01-1998
		EP 0853660 A	22-07-1998
		WO 9802522 A	22-01-1998
		JP 2000500026 T	11-01-2000
-----			